

10/532877
PCT/EP 03/11612



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

REC'D 04 DEC 2003

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02024251.7

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.I(a) OR (b)



Anmeldung Nr:
Application no.: 02024251.7
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 31.10.02
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

MERCK PATENT GmbH
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Mit organischen Polymeren beschichtete anorganische monolithische Formkörper

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

G01N30/48

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignés lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**Mit organischen Polymeren beschichtete
anorganische monolithische Formkörper**

- 1 -

Mit organischen Polymeren beschichtete anorganische monolithische Formkörper

Die vorliegende Erfindung betrifft anorganische monolithische Formkörper,
5 deren Oberfläche mit physi- oder chemisorbierten organischen Polymeren
beschichtet ist, sowie Verfahren zur Herstellung derartiger Materialien.

Die erfindungsgemäßen Materialien eignen sich hervorragend als
Sorbenzien für die Chromatographie, insbesondere für die
Hochdruckflüssigkeitschromatographie von biologischen Materialien.

10

Chromatographische Trägermaterialien bzw. Sorbenzien, die zur
Auf trennung oder Reinigung von biologischen Materialien, wie Proteinen,
Nukleinsäuren etc. eingesetzt werden, müssen neben guten Trenn-
eigenschaften eine hohe Alkalistabilität aufweisen. Grund dafür sind

15

insbesondere spezielle Reinigungs- und Sterilisationsverfahren, denen die
Sorbenzien unterworfen werden.

Beispielsweise wird bei dem sogenannten clean in place Verfahren das
Sorbens in Abhängigkeit von der Säulendimension über einen Zeitraum von
20 10 Minuten bis zu drei Stunden mit 1 M Natronlauge behandelt. Um eine
Verkeimung zu verhindern, werden die Trägermaterialien für eine
Langzeitlagerung in 0,1 M Natronlauge aufbewahrt. Nicht alle
Trägermaterialien sind unter derartigen Bedingungen stabil. Beispielsweise
sind anorganische Trägermaterialien auf Basis von Siliziumdioxid dabei oft
25 nicht ausreichend stabil.

Aus diesem Grund werden in der Biochromatographie häufig organische
Polymere, wie Dextran, Agarose, Cellulose, Polystyrol oder
Methacrylatester, oder mit derartigen organischen Polymeren beschichtete
30 anorganische partikuläre Materialien als Trägermaterialien eingesetzt.

- 2 -

Beispiele für Polymer-beschichtete anorganische Partikel finden sich z.B. in US 4,308,254 oder US 5,271,833. US 4,308,254 offenbart anorganische poröse Partikel, z.B. aus Silika, Aluminium-, Magnesium- oder Titan-Oxid, die mit Polysaccharid-Polymer beschichtet sind. US 5,271,833 offenbart anorganische Oxid-Partikel, die mit einem organischen Polymer umgeben sind.

5

Nachteil der rein organischen Polymere ist eine häufig ungünstige Porenstruktur und daraus resultierend eine zu geringe spezifische Oberfläche. Zudem quellen insbesondere wenig vernetzte Polymere in bestimmten Lösungsmitteln stark auf.

10

Bei Polymer-beschichteten Partikeln können diese Nachteile nur bis zu einem gewissen Grad durch den stabilen anorganischen Kern behoben werden. Insbesondere müssen zur Gewährleistung einer ausreichend hohen Trennleistung zumeist recht kleine Partikel eingesetzt werden, was zu einer starken Erhöhung des Säulenrückdrucks führt. Insbesondere bei hohem Druck lagern sich die Teilchen relativ dicht zusammen. Dabei wird die flexible Polymerschicht, vor allem durch den unflexiblen anorganischen Kern stark deformiert und teilweise sogar zerstört. Auch das führt natürlich zu einer erheblichen Verschlechterung der Trennleistung.

15

Einen weiteren Ansatz offenbart DE 199 29 073. Hier werden die Poren eines porösen anorganischen Stabs vollständig mit einer Polymerphase aus untereinander verbundenen kugelförmigen Teilchen gefüllt. Zwar lassen sich Formkörper, deren Poren vollständig mit Polymer gefüllt, relativ leicht herstellen, sie zeigen aber durch die vollständig mit Polymerkugeln gefüllten Poren nur eine mäßige Eignung für chromatographische Anwendungen. Zum einen haben die Polymerkugeln in den Kanälen des Monolithen natürlich dieselben Eigenschaften wie Polymerkugeln, die direkt in eine Säule gepackt sind, und somit auch dieselben Nachteile. Zum anderen ist die Gefahr groß, dass gerade kleinere Kanäle völlig verstopfen

20

- 3 -

und so ungleichmäßige Druckverhältnisse im Monolithen entstehen, die wiederum zu einer Verschlechterung der Trenneigenschaften führen.

Es wurde nun gefunden, dass die oben genannten Nachteile durch den

- 5 Einsatz von Polymer-beschichteten anorganischen monolithischen Formkörpern behoben werden können. Die anorganischen porösen monolithischen Formkörper werden dazu gleichmäßig mit einer Beschichtung aus organischem Polymer überzogen. Durch die vorgegebene rigide Struktur des monolithischen Materials wird eine 10 Verformung oder Zerstörung des Sorbens auch bei hohem Druck verhindert. Zudem können durch geeignete Wahl der Porenstruktur des anorganischen Formkörpers und der Beschichtungsverfahren Sorbenzien hergestellt werden, die selbst bei hohen Flußraten nur einen moderaten Säulenrückdruck zeigen.

15

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher poröse anorganische monolithische Formkörper, die mit mindestens einem organischen Polymer beschichtet sind.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den porösen anorganischen monolithischen Formkörpern um Materialien auf Basis von SiO₂.

25

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die porösen anorganischen monolithischen Formkörper eine bimodale Porenstruktur mit Mesoporen mit einem Durchmesser zwischen 2 und 100 nm und Makroporen mit einem mittleren Durchmesser von über 0,1 µm auf.

30

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den organischen Polymeren um Polystyrole oder Polymethacrylate.

- 4 -

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das organische Polymer auf dem anorganischen Formkörper physisorbiert.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Verfahren zur

5 Herstellung von porösen anorganischen monolithischen Formkörpern, die mit mindestens einem organischen Polymer beschichtet sind, das folgende Verfahrensschritte aufweist:

- a) Bereitstellen eines porösen anorganischen monolithischen Formkörpers
- b) Tränken des porösen anorganischen monolithischen Materials aus

10 Schritt a) mit einer Beschichtungslösung enthaltend zumindest organische Präpolymere oder Mono- und/oder Oligomere.

- c) Beschichtung des Formkörpers, wobei der Formkörper während der Beschichtung zumindest an den Längsseiten mit einem inertem Material dicht ummantelt ist oder in einem inerten Lösungsmittel gelagert wird

15 d) Waschen und Trocknen des Formkörpers aus Schritt c) zur Entfernung von Reaktionsrückständen und Lösungsmittel

In einer bevorzugten Ausführungsform werden in Schritt c) die Präpolymere oder Monomere und/oder Oligomere aus der Beschichtungslösung auf den anorganischen Formkörper aufgefällt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Ausfällung durch Temperaturerniedrigung.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Formkörper zur chromatographischen Trennung mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung und/oder Aufreinigung von biologischen Materialien.

30 Formkörper im Sinne der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Formkörper, die als Einzelstück für chromatographische Trennungen eingesetzt werden können und nicht wie Partikel in großer Zahl in eine

- 5 -

Säule gefüllt werden. Insbesondere sind dies flache oder säulenförmige Formkörper. Flache Formkörper haben ihre größte Ausdehnung quer zur Durchflußrichtung des Elutionsmittels. Besonders bevorzugt werden säulenförmige Formkörper, die eine gleich lange oder längere Ausdehnung entlang der Achse haben, die von den Elutionsmitteln durchströmt wird.

Die Größe und Dimension der Formkörper entspricht den in der zum Einsatz in der Chromatographie üblichen Dimensionen. Flache Formkörper haben typischerweise eine Dicke zwischen 0,2 und 20 µm, säulenförmige Formkörper haben typischerweise einen Durchmesser zwischen 0,1 cm und 5 cm und eine Länge (längste Ausdehnung) zwischen 1 und 30 cm.

Für präparative Trennungen können die angegebenen Dimensionen entsprechend der Dimensionen bekannter Säulendimensionen überschritten werden. Für miniaturisierte Anwendungen können die angegebenen Dimensionen bis in den Bereich von Kapillaren unterschritten werden.

Die porösen anorganischen monolithischen Formkörper bestehen typischerweise aus anorganischen Oxiden, wie Aluminiumoxid, Titandioxid oder bevorzugt Siliziumdioxid.

Von großer Bedeutung für die Eignung der erfindungsgemäß beschichteten Formkörper als chromatographische Sorbenzien ist die Porenstruktur der anorganischen Formkörper. Sie beeinflußt zum einen, wie homogen die Polymer-Beschichtung auf den Formkörper aufgebracht werden kann. Zum anderen hat sie Einfluß auf die Trennleistung und den Säulenrückdruck der beschichteten Formkörper. Erfindungsgemäß geeignete Formkörper weisen zumindest Poren auf, die auch nach der Beschichtung noch ein Durchströmen des Formkörpers ermöglichen. Bevorzugt sind daher Materialien, die zumindest Makroporen aufweisen.

Als besonders vorteilhaft haben sich Materialien mit einer bimodalen Porenverteilung erwiesen, d.h. Formkörper, die sowohl Makro- als auch

- 6 -

Mesoporen aufweisen. Durch die zusätzlichen Mesoporen gelingt es, bei geringem Flüssigkeitsgegendruck eine höhere Oberfläche zur Verfügung zu stellen.

- 5 Besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß daher anorganische poröse monolithische Formkörper eingesetzt, die Makroporen mit einem mittleren Durchmesser von über 0,1 µm aufweisen sowie Mesoporen in den Wänden der Makroporen, wobei die Mesoporen einen Durchmesser zwischen 2 und 100 nm haben. Derartige Materialien können beispielsweise nach einem
10 Sol-Gel Prozeß entsprechend WO 95/03256 und besonders bevorzugt entsprechend WO 98/29350 hergestellt werden.

- Zur Beschichtung der Formkörper geeignete organische Polymere sind organische Materialien, die als Oligomer und/oder Polymer auf den
15 Formkörper aufgebracht werden können oder organische Oligomere und/oder Monomere, die durch Polymerisation oder Polykondensation auf den Formkörper aufgebracht werden. Die organischen Polymere können auf dem Formkörper chemi- oder physisorbiert sein.

- 20 Geeignete organische Polymere sind beispielsweise Polystyrole, Polymethacrylate, Melamine, Polysaccharide, Polysiloxane sowie deren Derivate oder Copolymeren zweier oder mehrerer geeigneter Verbindungen, wie beispielsweise eine Beschichtung aus Tetraalkoxysilan und Methyltrialkoxysilan. Geeignet sind auch Copolymeren der zuvor genannten
25 Stoffe mit Monomeren, die bereits für die Chromatographie geeignete Separationseffektoren tragen, wie z.B. Copolymerisate aus Polystyrolen mit Verbindungen, die Ionenaustauschergruppen tragen. Bevorzugt sind chemi- oder physisorbierte Polystyrole oder Polystyrol-Derivate, besonders bevorzugt sind physisorbierte Polymethacrylate oder Polymethacrylat-Derivate, insbesondere Poly(methacrylat), Poly(2-hydroxyethylmethacrylat), ein Copolymer aus 2-Hydroxyethylmethacrylat und Ethylmethacrylat oder Poly(octadecylmethacrylat).

- 7 -

Die Polymerbeschichtung kann erfindungsgemäß auf verschiedene Weise erfolgen:

- 1) durch Polymerisation bzw. Polykondensation von physisorbierten Monomeren und/oder Oligomeren ohne Ausbildung von kovalenten Bindungen zum anorganischen Formkörper
- 2) durch Polymerisation bzw. Polykondensation von physisorbierten Monomeren und/oder Oligomeren mit Ausbildung von kovalenten Bindungen zum anorganischen Formkörper
- 3) durch Immobilisation (Physisorption) von Präpolymeren ohne Ausbildung von Bindungen zum anorganischen Formkörper
- 4) durch Chemisorption von Präpolymeren auf den anorganischen Formkörper

Eine Lösung, die für die erfindungsgemäße Beschichtung der Formkörper eingesetzt wird enthält demnach entweder organische Präpolymere oder Monomere und/oder Oligomere. Zudem enthält sie typischerweise ein geeignetes Lösungsmittel und optionale weitere Bestandteile, wie z.B. Radikalstarter. Sie wird erfindungsgemäß als Beschichtungslösung bezeichnet.

Präpolymere bedeutet hierbei, dass bereits oligomerisierte und/oder polymerisierte Verbindungen eingesetzt werden, die nach dem Einbringen in den Formkörper keiner weiteren Polymerisationsreaktion mehr unterzogen werden, d.h. nicht mehr weiter miteinander vernetzt werden. Je nach Art des Aufbringens werden sie an den Formkörper adsorbiert (Physisorption) oder kovalent gebunden (Chemisorption).

Monomere und/oder Oligomere dagegen sind zur Polymerisation oder Polykondensation geeignete Verbindungen, die nach dem Einbringen in den Formkörper durch Polymerisation oder Polykondensation weiter vernetzt werden. Oligomere sind dabei Verbindungen, die vorab bereits durch Vernetzung von Monomeren erzeugt wurden.

- 8 -

- Es wurde gefunden, dass Verfahren zur Beschichtung von Partikeln nur schlecht auf die Beschichtung von monolithischen Formkörpern übertragen werden können. Grund dafür ist insbesondere die schlechte Zugänglichkeit des Inneren eines Formkörpers. Um beschichtete Formkörper mit guten chromatographischen Trenneigenschaften zu erzeugen, muß die Beschichtung des Formkörpers bezüglich ihrer Dicke und ihrer chemischen Zusammensetzung über den gesamten Formkörper homogen sein. Da der Formkörper erfindungsgemäß nicht vollständig mit dem organischen Polymer ausgefüllt wird, muß, um ein Verstopfen der Poren des Formkörpers zu verhindern, die Verteilung der Beschichtung im Inneren des Formkörpers bestmöglich kontrolliert werden oder dem organischen Polymer ein Porogen zugesetzt werden, das Durchgangsporen bildet.
- Verfahren zur Beschichtung von Partikeln beinhalten häufig das Aufbringen einer Polymerlösung oder einer Lösung aus Monomer und Radikalstarter. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt. Dieses Verfahren lässt sich bei der Beschichtung von Formkörpern nicht anwenden. Bei der Trocknung von monolithischen Formkörpern erfolgt der Verdampfungsprozess des Lösungsmittels über eine relativ kleine Oberfläche (der Monolithaußenoberfläche). Durch die Trocknung wird aus dem Inneren des Formkörpers immer wieder Polymerlösung nachgezogen (Löschblatteffekt), was eine Herstellung von homogenen Beschichtungen nahezu unmöglich macht.
- Es wurde gefunden, dass für die homogene Beschichtung von Formkörpern Verfahren geeignet sind, bei denen die Beschichtungslösung in den Formkörper eingebracht wird und die Chemi- oder Physisorption der Polymerbeschichtung erfolgt, ohne das Lösungsmittel der Beschichtungslösung zuvor zu entfernen. Erst nach erfolgter Chemi- oder Physisorption wird das Lösungsmittel entfernt.

- 9 -

Insbesondere sind Verfahren geeignet, bei denen eine Polymerisation oder Polykondensation von Monomeren und/oder Oligomeren in Anwesenheit des Lösungsmittels erfolgen kann oder bevorzugt Verfahren, bei denen Präpolymere oder Monomere und/oder Oligomere aus dem Lösungsmittel auf den Formkörper aufgefällt werden können.

5

In beiden Fällen ist weiterhin darauf zu achten, dass die Beschichtung des Formkörpers nicht zu einem übermäßig dicken Polymerüberzug auf der Außenwand des Formkörpers führt. Da die Formkörper zum Einsatz in der Chromatographie in der Regel mit einem Säulenmantel flüssigkeitsdicht umschlossen werden müssen und mit Anschlässen für Elutionsmittelzu- und ablauf versehen werden müssen, würde eine dicke und gegebenenfalls unregelmäßige Beschichtung der Außenwand eine Ummantelung stark erschweren. In der Regel müsste die Beschichtung der Außenwand zunächst entfernt werden. Das wiederum kann die Außenwand des Formkörpers beschädigen.

10

Daher wird die Beschichtung der Formkörper erfindungsgemäß bevorzugt bereits in einer Ummantelung durchgeführt, die zumindest die Längsseite des Formkörpers dicht umschließt. Die Ummantelung sollte inert gegenüber den bei der Beschichtung beteiligten Reagenzien und Lösungsmitteln sein. Die Beschichtungslösung kann dann bevorzugt, ähnlich wie bei einer Chromatographiesäule, über geeignete Anschlüsse in den ummantelten Formkörper gepumpt werden.

15

20

Genauso kann die Beschichtung erfolgen, in dem ein nicht ummantelter Formkörper für die Beschichtung in ein inertes Lösungsmittel eingebracht wird. Dabei wird der Formkörper zunächst mit der Beschichtungslösung getränkt. Anschließend wird er zur Durchführung der Beschichtung möglichst vollständig in ein inertes Lösungsmittel getaucht. Inert bedeutet in diesem Fall, dass das Lösungsmittel nicht an der Polymerisation oder Polykondensation beteiligt ist.

25

30

- 10 -

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann es gegebenenfalls notwendig sein, den Formkörper vor dem Befüllen mit der Beschichtungslösung chemisch zu modifizieren, um die Oberfläche des

- 5 anorganischen Materials mit funktionellen Gruppen zu versehen, die zur Physi- oder Chemisorption der organischen Polymerbeschichtung notwendig sind. Geeignete Verfahren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Sorbenzien bekannt. Zur Einführung der funktionellen Gruppen eignen sich im Prinzip die Reaktionen, die auch zur Einführung von
10 Separationseffektoren in chromatographische Trägermaterialien verwendet werden. Für Formkörper auf Basis von SiO₂ ist dies insbesondere die Umsetzung mit geeignet funktionalisierten Silanen. Die Silane können beispielsweise polymerisationsfähige Gruppen tragen, die bei der Aufpolymerisation von Monomeren und/oder Oligomeren eine kovalente
15 Anbindung an den Formkörper ermöglichen. Verfahren zur Einführung derartiger Funktionalitäten werden beispielsweise in WO 94/19687 offenbart.

- 20 Genauso kann es für eine homogene Beschichtung der Formkörper vorteilhaft sein, einen geeigneten Radikalstarter vor dem Tränken des Formkörpers mit der Beschichtungslösung homogen auf der Oberfläche des Formkörpers zu verteilen, insbesondere durch kovalente Anbindung an den Formkörper.

- 25 Zur Beschichtung der anorganischen Formkörper mit dem organischen Polymer wird der Formkörper zunächst mit einer Beschichtungslösung getränkt. Dies kann z.B. durch Eintauchen des Formkörpers in eine entsprechende Lösung erfolgen oder, im Falle eines ummantelten Formkörpers durch Durch- bzw. Aufpumpen der Beschichtungslösung.
30

Die Beschichtung des Formkörpers erfolgt dann je nach Art der Beschichtungslösung. Enthält die Beschichtungslösung Präpolymere,

- 11 -

werden diese unter geeigneten Bedingungen auf den Formkörper aufgefällt. Wird eine Chemisorption der Präpolymere angestrebt, kann diese beispielsweise durch Temperaturerhöhung, Temperaturerniedrigung, Bestrahlung oder Zugabe von Reagenzien erfolgen, die die chemische
5 Reaktion zwischen Formkörper und Präpolymer starten.

Als besonders vorteilhaft zur Herstellung einer homogenen Beschichtung hat sich eine Verfahrensvariante erwiesen, bei der die Präpolymere aus der Beschichtungslösung durch Unterschreitung des Löslichkeitsproduktes
10 ausgefällt werden, bevorzugt durch Temperaturerniedrigung. Hierbei entsteht durch die starke Temperaturerniedrigung eine übersättigte Lösung, aus der die Präpolymere sich gleichmäßig auf dem Formkörper ablagern. Bei diesen Verfahrensvarianten kann die Geschwindigkeit der Ausfällung z.B. durch die Geschwindigkeit der Temperaturveränderung gesteuert
15 werden.

Bei Präpolymeren, die in der Beschichtungslösung unlöslich sind und daher als Suspension aufgetragen werden, kann auch eine Erhöhung der Temperatur gegebenenfalls eine gleichmäßige Beschichtung des
20 Formkörpers bewirken, insbesondere, wenn die Polymere durch die Temperaturerhöhung schmelzen und sich dadurch auf der Oberfläche des Formkörpers ablagern.

Sollen die Präpolymere kovalent an den Formkörper gebunden werden,
25 kann die Anbindung nach der Ausfällung durch geeignete Initiierung, wie Bestrahlung, Zugabe von Reaktionsstartern etc., gestartet werden.

Für die Polymerisation oder Polykondensation von Monomeren und/oder Oligomeren kann die Beschichtungsreaktion beispielsweise durch Variation
30 der Temperatur, Bestrahlung oder Zugabe eines Radikalstarters initiiert werden.

- 12 -

Als besonders vorteilhaft haben sich hier Verfahren erwiesen, bei denen die Monomeren und/oder Oligomeren z.B. durch Temperaturniedrigung zunächst durch Unterschreitung des Löslichkeitsproduktes aus der

Beschichtungslösung ausgefällt werden und erst nach der Ausfällung

5 polymerisiert oder polykondensiert werden. Auf diese Weise kann eine besonders homogene Verteilung des Polymers auf der Oberfläche des Formkörpers erzeugt werden. Falls Radikalstarter für die Initiierung der Polymerisation benötigt werden, können diese vorab auf den Formkörper aufgebracht werden, mit den Monomeren und/oder Oligomeren ausgefällt

10 werden oder auch in gelöstem Zustand in der Beschichtungslösung verbleiben.

Genauso vorteilhaft ist es, das organische Polymer *in situ* in der Beschichtungslösung zu bilden und dieses dann auf den Formkörper aufzufällen. Dies ist beispielsweise möglich, wenn durch die Molekulargewichtserhöhung eine Unterschreitung der Löslichkeit erzeugt wird und das Polymer aus der Beschichtungslösung ausfällt und sich auf dem Formkörper ablagert. Genauso kann die Ausfällung wie im Falle einer Beschichtungslösung, die bereits Präpolymere enthält, durch eine

20 Temperaturniedrigung erreicht werden.

Sollen die aufgefällten Polymere kovalent an den Formkörper gebunden werden, kann die Anbindung nach der Ausfällung durch geeignete Initiierung, wie Bestrahlung, Zugabe von Reaktionsstartern etc., gestartet werden.

25

Die Dauer der Beschichtung ist abhängig von der Art der Beschichtungsreaktion.

30 Es ist zudem möglich, nacheinander mehrere, auch unterschiedliche, Polymerschichten auf den Formkörper aufzutragen.

- 13 -

Nach Beendigung der Beschichtung wird der Formkörper gründlich mit geeigneten Lösungsmitteln gespült, um Reaktionsrückstände, wie nicht abreagierte Monomere oder nicht adsorbiertes Polymer, zu entfernen.

- 5 Anschließend wird der beschichtete Formkörper, bevorzugt im Vakuum, getrocknet.
- 10 Die erfindungsgemäß beschichteten Formkörper können direkt für chromatographische Trennungen eingesetzt werden oder zuvor mit Separationseffektoren funktionalisiert werden. Dies sind beispielsweise ionische, hydrophobe, chelatisierende oder chirale Gruppen. Verfahren zur Einführung derartiger Funktionalitäten sind dem Fachmann auf dem Gebiet der chromatographischen Trägermaterialien bekannt.
- 15 Besonders geeignet sind die erfindungsgemäßen Formkörper für die Biochromatographie, da sie sich bei Verwendung basenstabiler organischer Polymere durch eine gute Basenstabilität auszeichnen und zugleich gute Trennleistungen und einen geringen Säulenrückdruck zeigen.
- 20 Weiterhin können die erfindungsgemäß beschichteten Formkörper als Festphase für die Immobilisierung von Katalysatoren, z.B. Biokatalysatoren wie Enzymen, eingesetzt werden. Auch können geeignet funktionalisierte Formkörper als Reaktionspartner für die Durchflußsynthese dienen.
- 25 Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen ist durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

5 Beispiele

Beispiel 1: Vergleich der Eigenschaften eines C18-funktionalisierten Formkörpers mit einem erfindungsgemäßen polymerbeschichteten Formkörper

10

1.1 Herstellung von Monolithen mit Standard-C18-Modifizierung

Die übliche Methode zur Abschirmung einer Kieselgeloberfläche in der Chromatographie ist die Oberflächenmodifizierung unter Reaktion mit einem hydrophoben Silan.

15

Dafür werden 6 gut getrocknete (100°C im Vakuum) poröse monolithische Silika-Formkörper (Herstellung entsprechend WO 98/29350; Länge 15cm), die eine spezifische Oberfläche von 300 m²/g und ein Porenvolumen von 1ml/g aufwiesen, in ein Reaktionsgemisch von 100 ml Toluol und 15ml Octadecyldimethylchlorosilan gestellt. Um die Luft aus dem Formkörper zu

20

entfernen wird das Reaktionsgemisch evakuiert und mit Stickstoff wieder belüftet. Die Reaktion erfolgt durch Erhitzen für 24 Stunden auf 110°C. Nach der Reaktionszeit werden die Formkörper entnommen und durch Extraktion mit Toluol von nicht reagiertem Silan befreit. Nach Trocknung bei

25

Der Messung der Elementaranalyse ergibt einen Gehalt von 16,2% Kohlenstoff.

1.2 Herstellung von Formkörpern mit einer Polymerbeschichtung aus Styrol/Divinylbenzol

30

Die Beschichtung der Kieselgeloberfläche der Formkörper (gleiches Ausgangsmaterial wie unter 1.1) erfolgt durch Polymerisation einer

- 15 -

- Mischung aus Styrol und Divinylbenzol. Dazu wird zunächst eine Monomermischung aus 12 g Styrol und 6 g Divinylbenzol mit 0,5 g Azoisobutyronitril in 50 ml Toluol hergestellt.
- 6 gut getrocknete (100°C im Vakuum) Silika-Formkörper von 15cm Länge, die eine spezifische Oberfläche von 300 m²/g und ein Porenvolumen von 1ml/g aufweisen, werden in das Reaktionsgemisch gestellt. Um die Luft aus den Formkörpern zu entfernen, wird das Reaktionsgemisch evakuiert und mit Stickstoff wieder belüftet.
- Zur Polymerisation werden die getränkten Stäbe dann in eine Reaktionsapparatur mit frischem, auf 80°C vorgeheiztem, Toluol gestellt. Der Grund dafür ist, dass nur die Beschichtungslösung im Inneren des Formkörpers zur Reaktion gebracht werden soll, damit nicht eine äußere Polymer-Schicht auf dem Formkörper und/oder Lösungspolymer die Reinigung erschweren und die spätere Beständigkeitstests untersuchung verfälschen.
- Nach 5 Stunden bei 80°C werden die Formkörper entnommen und durch Extraktion mit Toluol von nicht abreagiertem Monomer und nicht adsorbiertem Polymer befreit. Nach Trocknung bei 100°C im Vakuum wird eine Gewichtszunahme von 6% festgestellt.
- Der Messung der Elementaranalyse ergibt einen Gehalt von 5,5% Kohlenstoff.

- 1.3 Umsetzung eines ummantelten Formkörpers, der eine polymerisierbare Funktionalisierung trägt, mit Styrol /Divinylbenzol**
- Die Beschichtung der Kieselgeloberfläche erfolgt in diesem Fall durch eine in-Situ Polymerisation von einer Mischung aus Styrol und Divinylbenzol. Um das Polymer kovalent anbinden zu können, wurde der Formkörper zunächst mit einer Mischung aus Toluol und Methacryloxypropyltrimethoxysilan umgesetzt.
- Ein gut getrockneter, zuvor mit PEEK ummantelter, Formkörper von 10cm Länge (Herstellung entsprechend WO 98/29350), der eine spezifische

- 16 -

Oberfläche von 300 m²/g und ein Porenvolumen von 1ml/g aufweist, wird in einem HPLC Ofen auf 80°C temperiert. Eine Mischung aus 20 g Toluol und 2 g Methacryloxypropyltrimethoxysilan wird mit einem Fluss von 0,5 ml/Minute durch den Formkörper gepumpt und anschließend mit Toluol

5 nachgewaschen.

Im Anschluss wird eine Monomermischung aus 6 g Styrol und 3 g Divinylbenzol mit 0,5 g Azoisobutyronitril in 50 ml Toluol hergestellt. Das zuvor entgaste Reaktionsgemisch wird mit einem Fluss von 0,5 ml/Minute durch den Formkörper, der in einem HPLC Ofen auf 80°C temperiert

10 wurde, gepumpt. Zur Entfernung von nicht abreagiertem Monomer und nicht adsorbiertem Polymer wird im Anschluss der Formkörper noch mit 50 ml Toluol bei 80°C gespült. Nach Trocknung bei 100°C im Vakuum wird eine Gewichtszunahme von 10% festgestellt.

Der Messung der Elementaranalyse ergibt einen Gehalt von 9,3% Kohlenstoff.

1.4 Test auf Stabilität der Polymerschicht

A) Statische Testung

Zur Testung der Abschirmung der Kieselgeloberfläche und Untersuchung auf Gleichmäßigkeit und Dichtigkeit der Polymerbeschichtung werden die Formkörper einer Natronlaugebehandlung ausgesetzt. Da Kieselgel eine hohe Löslichkeit in Natronlauge aufweist, muss die Oberflächenbelegung sich reduzieren, wenn das Trägermaterial angegriffen und aufgelöst wird.

25 Zur Testung werden die Formkörper in 100 ml einer Lösung aus 4 g NaOH in 1 l Wasser (0,1 N Natronlauge) gestellt und nach 1h, 5h und 24h jeweils Proben zur Untersuchung abgenommen. Die Muster werden durch intensives Extrahieren mit Wasser von löslichen Anteilen und restlicher Natronlauge befreit. Im Anschluss werden die Formkörper zunächst mit 30 Methanol und dann mit Toluol extrahiert, um nicht mehr adsorbierte Polymeranteile zu entfernen.

- 17 -

Die erhaltenen Muster werden getrocknet und durch Elementaranalyse untersucht.

Als Vergleich wurde der Versuch auch mit einer 1 N Natronlauge-Lsg. durchgeführt.

5

B) Dynamische Testung

Als Ergänzung wird der PEEK ummantelte Formkörper mit einer Lösung aus 4 g NaOH in 1 l Wasser (0,1 N Natronlauge) 24 Stunden mit einem Fluss von 0,2 ml/Minuten durchpumpt und durch Nachwaschen mit Wasser,

10

Methanol und Toluol gewaschen.

C) Ergebnis der Testung

Tabelle 1 zeigt den verbleibenden Kohlenstoffgehalt der Formkörper bzw. ihre Beschaffenheit nach unterschiedlich langer Behandlung mit Natronlauge:

15

FK1: C18 funktionalisierter Formkörper

FK2: mit Styrol/Divinylbenzol in Toluol beschichteter Formkörper (nach Beispiel 1.2)

20

FK3: mit Styrol/Divinylbenzol in Ummantelung beschichteter Formkörper (nach Beispiel 1.3) – hier konnte nur ein Wert ermittelt werden, da der Formkörper für die Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes aus der Ummantelung herausgebrochen werden musste.

25

	FK1	FK2	FK3
Ausgangswert	16,2%	5,5%	9,3%
1h (0,1N NaOH)	10,5%	5,5%	
5h(0,1N NaOH)	stark angelöst	5,4%	
24h(0,1N NaOH)	zerstört	5,4%	9,2%
1h (1N NaOH)	stark angelöst	5,4%	
5h (1N NaOH)	zerstört	5,3%	
24h(1N NaOH)	zerstört	5,3%	

30

Tabelle 1

- 18 -

Es konnte festgestellt werden, dass ein C-18 funktionalisierter Formkörper in Natronlauge deutlich an Masse und somit auch an Kohlenstoffmodifizierung verliert und teilweise zerstört oder komplett

5 aufgelöst wird. Dem gegenüber zeigen die polymerbeschichteten Muster eine gute Stabilität gegenüber der Natronlauge. Der Versuch zeigt, dass es durch die Beschichtung eines anorganischen Monolithen mit einem Polymer möglich ist, ein Misch-Material mit neuen Eigenschaften herzustellen.

10

Durch die Stabilitätsprüfung in alkalischer Lösung kann die Verkapselung der Formkörper durch die Polymerbeschichtung gezeigt werden. Es ist aber durchaus für manche Anwendungen auch sinnvoll, Beschichtungen mit Polymeren zu verwenden, die in Natronlauge instabil sind.

15

Dabei ist z.B. auch an die Herstellung von biokompatiblen Oberfläche mit hydrophilen Polymeren zu denken oder mit Polysachariden. Das Beispiel schränkt auch nicht die Herstellung von Polymeren auf anderen anorganischen Trägern ein.

20

1.5 BET Untersuchung

Die im beschichteten Formkörper FK2 wurden durch eine Messung der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens charakterisiert. Dabei ergab sich eine Oberfläche von $280\text{m}^2/\text{g}$ und ein Porenvolumen von $0,92\text{ml/g}$.

25

Mit dem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die Poren des Formkörpers nicht „zopolymerisiert“ wurden, sondern sich eine gleichmäßige Schicht auf der Oberfläche gebildet hat. Somit sind die Poren des Formkörpers nicht vollständig mit Polymer gefüllt.

30

- 19 -

Beispiel 2 Herstellung von beschichteten Fremdkörpern durch Ausfällung von Präpolymeren

2.1 Synthese

Die folgenden Reaktionen wurden in einer Apparatur nach Abbildung 1
5 durchgeführt. Der Formkörper (1) ist mit einer druckstabilen Ummantelung (2) umgeben. Die Beschichtungslösung, sowie weitere Waschlösungen etc. werden in Behälter (3) vorgemischt und mittels einer Pumpe (4) über ein Druckreservoir (5) in einen Vorlagebehälter (6) aus druckfestem Stahl und von dort durch den Formkörper (1) in einen Abfallbehälter (7) gepumpt.

10

Zunächst wird der Formkörper (Chromolith®, Firma Merck KGaA, Darmstadt, Material SiO₂; Innendurchmesser ID = 4,6 mm; Länge L = 25 mm) mit dem verwendeten Lösungsmittel DMF konditioniert. Somit liegt ein vollständig mit Lösungsmittel getränkter Formkörper als
15 Ausgangsmaterial vor.

15

Es wird eine Beschichtungslösung aus Poly(methacrylat)-Lösung (Konzentration c = 10 mg ml⁻¹) in Dimethylformamid DMF (p.a.) hergestellt und in den Vorlagebehälter (6) gegeben. Mittels einer HPLC-Pumpe (Marke Bischoff), wird in dem teilweise mit Luft gefüllten Druckreservoir (5) Druck erzeugt und somit die Beschichtungslösung in den Formkörper gedrückt. Da Luft als Druckvermittler fungiert (Luftpolster), ist sichergestellt, daß die Konzentration des Polymers bei diesem Verfahren konstant bleibt. Der hier aufzuwendende Druck beträgt ~ 0,4 bar bei einer Flußrate von 1 ml min⁻¹.
20 Das Volumen der nun im Formkörper befindlichen Lösung beträgt ca. V = 0,33 ml. Nach Durchfluß von 3 ml wird der Formkörper abgenommen, mittels Verschraubungen dicht verschlossen und anschließend für 40 min in das vorbereitete bei -55 °C temperierte Kältebad (Methanol/Trockeneis)
25 gegeben. Danach wird das Lösungsmittel mittels einer Vakuumlinie bei 40 °C, 1 Torr für 12 h, entfernt.
30

- 20 -

In ähnlicher Weise kann die Beschichtung statt mit Poly(methacrylat) [PEMA] z.B. auch mit Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) [P2HEMA], einem Copolymer aus 2-Hydroxyethylmethacrylat und Ethylmethacrylat [P2HE.-E] oder Poly(octadecylmethacrylat) [POMA] erfolgen.

5

2.2 Kohlenstoffgehalt und Morphologie

Der über Elementaranalyse bestimmte Kohlenstoffgehalt der beschichteten Formkörper ist in Tabelle 2 aufgeführt.

10

	P2HEMA	P2HE.-E	PEMA	POMA
% C	0,97	1,78	2,14	1,05

Tabelle 2

- 15 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) zeigen, dass bezüglich der Morphologie kein Unterschied zwischen den beschichteten und den unbeschichteten Formkörpern besteht. Die Makroporenstruktur der Formkörper bleibt erhalten. Abbildung 2 zeigt den Vergleich einer REM-Aufnahme eines unbeschichteten Formkörpers (Chromolith® der Firma Merck KGaA) (Figur 2 A) und eines mit einem Copolymer aus 2-Hydroxyethylmethacrylat und Ethylmethacrylat beschichteten Formkörpers (Figur 2 B).
- 20

2.3 Chromatographisches Verhalten

- 25 Vor den chromatographischen Tests wird der nun mit Poly(methacrylat) beschichtete Formkörper noch 1 h mit der mobilen Phase bei 1 ml min^{-1} konditioniert.

- 30 Für die chromatographischen Untersuchungen wurden drei ausgewählte Proteine: Lysozym, Cytochrom C, Myoglobin (LCM-Testgemisch) als Testmischung verwendet.

- 21 -

Die Proteine wurden in Wasser ohne Trifluoressigsäure (TFA)-Zusatz gelöst. Als mobile Phase wurde ein organisch-wässriger Eluent mit TFA-Zusatz im Gradienten-Modus verwendet:

- 5 Fluß: 1 ml/min; Detektion: 215 nm, 400 nm;
Raumtemperatur
Injektionsvolumen: 5 µl
von 95/5 % (v/v) A/B in 5 min zu 5/95 % (v/v) A/B; mit
A: Wasser + 0.1 % TFA,
10 B: Acetonitril + 0,09 % TFA

Der Gegendruck betrug für Poly(methacrylat)-beschichtete Formkörper ca. 20bar, für den unbeschichteten Formkörper (Chromolith[®]) ca. 30bar.

- 15 Die erhaltenen Chromatogramme zeigen, dass sich die Elutionsprofile der Proteinmischung wie erwartet in Abhängigkeit von der Hydrophobie der Beschichtung ändern. Die Trennleistung und der geringe Säulenrückdruck belegen die gute Eignung der erfundungsgemäßen Materialien als Sorbens
20 für die Chromatographie.

25

30

- 22 -

Ansprüche

1. Formkörper bestehend aus einem porösen anorganischen monolithischen Formkörper, der mit mindestens einem organischen Polymer beschichtet ist.
- 5 2. Formkörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der poröse anorganische monolithische Formkörper aus SiO_2 besteht.
- 10 3. Formkörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der poröse anorganische monolithische Formkörper eine bimodale Porenstruktur mit Mesoporen mit einem Durchmesser zwischen 2 und 100 nm und Makroporen mit einem mittleren Durchmesser von über 0,1 μm aufweist.
- 15 4. Formkörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem organischen Polymer um Polystyrol und/oder Polymethacrylat handelt.
- 20 5. Formkörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das organische Polymer auf dem anorganischen Formkörper physisorbiert ist.
- 25 6. Verfahren zur Herstellung von porösen anorganischen monolithischen Formkörpern, die mit mindestens einem organischen Polymer beschichtet sind, durch
 - a) Bereitstellen eines porösen anorganischen monolithischen Formkörpers
 - b) Tränken des porösen anorganischen monolithischen Formkörpers aus Schritt a) mit einer Beschichtungslösung enthaltend zumindest organische Präpolymere oder organische Mono- und/oder Oligomere.
- 30

- 23 -

- c) Beschichtung des Formkörpers, wobei der Formkörper während der Beschichtung zumindest an den Längsseiten mit einem inerten Material dicht ummantelt ist oder in einem inerten Lösungsmittel gelagert wird
- d) Waschen und Trocknen des Formkörpers aus Schritt c) zur Entfernung von Reaktionsrückständen und Lösungsmittel

5

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritt c) die Präpolymere oder Monomere und/oder Oligomere aus der Beschichtungslösung auf den anorganischen Formkörper aufgefällt werden.

10

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Auffällen durch Temperaturerniedrigung erfolgt.

15 9. Verwendung eines Formkörpers nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 zur chromatographischen Trennung mindestens zweier Substanzen.

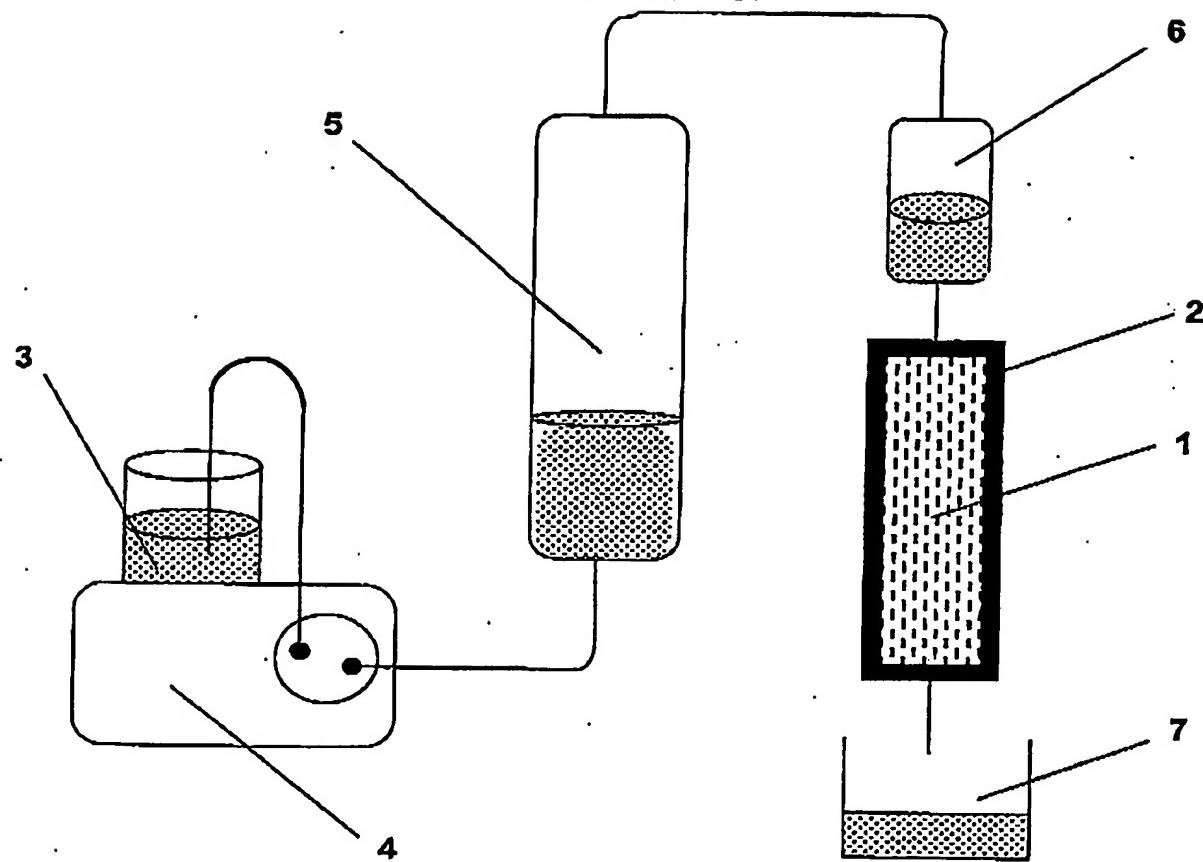
20

25

30

1/2

Fig. 1



31. Okt. 2007 14:09
0049 0121 12/121

0049 0121 12/121

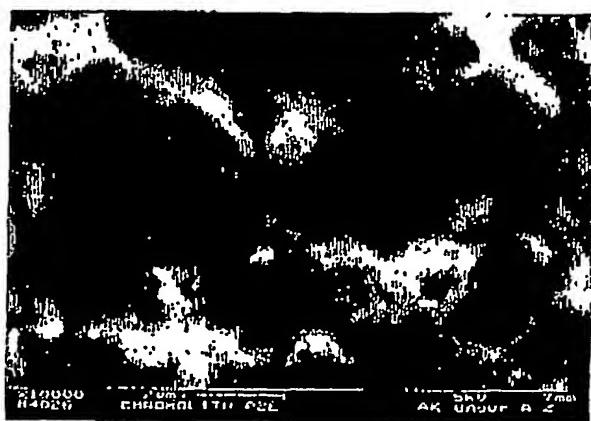
2/2

Fig. 2

A



B



- 24 -

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft anorganische monolithische Formkörper,
deren Oberfläche mit physi- oder chemisorbierten organischen Polymeren
beschichtet ist, sowie Verfahren zur Herstellung derartiger Materialien.

Die erfindungsgemäßen Materialien eignen sich hervorragend als
Sorbenzien für die Chromatographie, insbesondere für die
Hochdruckflüssigkeitschromatographie von biologischen Materialien.

10

15

20

25

30

This Page Blank (uspto)

PCT Application

EP0311612

